昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, March 2012, 55(3): 344 – 356 ISSN 0454-6296

DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用

乔玮娜[1], 万方浩[1,2], 张爱兵[3], 闵 亮[1], 张桂芬[1,2,*]

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心, 北京 100081; 3. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048)

摘要: 蓟马类害虫种类多、体型小, 传统的形态学鉴定方法难以快速准确识别。本研究利用 DNA 条形码通用型引物, 以我国田间常见的 25 种蓟马为靶标扩增其线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅰ(mitochondrial cytochrome c oxidase subunit Ⅰ gene, mtDNA COⅠ)基因(约 650 bp), 通过对靶标片段碱基序列的测序及比对分析, 以邻接法(NJ 法)构建系统发育树, 并以 Kimura 双参数模型计算种内、种间遗传距离。结果表明: 聚类分析与形态学鉴定结果一致, 表现为较长的种间分支和较短的种内分支, 每个单系分支对应一个物种, 同一物种不同单倍型的最初分支自展值均为 100%。25 种蓟马的种内平均遗传距离为 0.0027, 种间平均遗传距离为 0.2757, 种间遗传距离为种内遗传距离的 102.1 倍; 而且种内、种间遗传距离没有重叠区域。结果说明基于 COⅠ基因的 DNA 条形码技术可以用于不同种类蓟马的快速准确鉴别。

关键词: 缨翅目; 蓟马; COⅠ基因; DNA 条形码; 分子鉴定; 遗传距离; 系统发育树

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)03-0344-13

Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China

QIAO Wei-Na[1], WAN Fang-Hao[1,2], ZHANG Ai-Bing[3], MIN Liang[1], ZHANG Gui-Fen[1,2,*] (1. State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; 3. College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China)

Abstract: Thrips (Insecta: Thysanoptera) are of a species-rich order with small size, which makes them hard to be identified quickly and accurately by traditional morphological identification methods. In this study, the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit Ⅰ (COⅠ) genes of 25 thrips species common in China were amplified using DNA barcoding universal primers. The obtained partial COⅠ fragments (about 650 bp) were sequenced. The phylogenetic tree was established by a neighbor-joining (NJ) method. The intra- and inter-species genetic distances were calculated with MEGA version 4.0 software using the Kimura 2-Parameter model. The results indicated that the identification results based on the phylogenetic tree obtained was consistent with those based on morphological characteristics for the 25 thrips species. In these species, the lengths of intra-species branches were much shorter than those of the inter-species branches. Each branch corresponded to one species and all bootstrap values of the original divergence among different haplotypes within one species were 100%. The genetic distance between species for these 25 species was 102.1 times as high as the corresponding values within species (0.2757 *vs*. 0.0027). There was no overlap between inter- and intra- species genetic distances. The results suggest that the DNA barcoding based on partial COⅠ gene can provide rapid and accurate identification of these thrips species.

Key words: Thysanoptera; thrips; COⅠ gene; DNA barcoding; molecular identification; genetic distance; phylogenetic tree

---

基金项目: 国家重点基础研究发展规划("973"计划)项目(2009CB119200); 国家公益性行业(农业)科研专项(201103026); 国家自然科学基金项目(30971967)

作者简介: 乔玮娜, 女, 1985 年 10 月生, 河北张家口人, 硕士研究生, 研究方向为入侵生物学与分子生态学, E-mail: weinaqiao05@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guifenzhang3@mail.caas.net.cn

收稿日期 Received: 2011-12-16; 接受日期 Accepted: 2012-03-06

缨翅目（Thysanoptera）昆虫统称为蓟马（thrips）。有记载的蓟马种类大约有 5 500 种，其中有 1% 的种类可以对农作物造成严重危害（Morse and Hoddle，2006）。蓟马类害虫个体微小，体长一般不足 2 mm，适生性强，繁殖率高，危害严重且不易被发现（Morse and Hoddle，2006）。蓟马的危害方式主要有两种，即直接危害和间接危害。直接危害是指以锉吸式口器锉破植物表皮组织吮吸汁液，形成银白色斑点，影响植物的光合作用。当单子叶植物幼苗受害严重时，常使全叶枯干；而双子叶植物遭受蓟马严重危害后，常造成植株无头或多头，严重影响植物的生长发育（韩运发，1997；路虹等，2007）。间接危害是指有些蓟马种类如西花蓟马 *Frankliniella occidentalis*（Pergande）、烟蓟马 *Thrips tabaci*（Lindeman）、花蓟马 *F. intonsa*（Trybom）等能传播植物病毒，如西花蓟马传播凤仙斑点坏死（impatiens necrotic spot virus，INSV）等病毒（Wijkamp and Peters，1993；Wijkamp *et al.*，1995；Bezzara *et al.*，1999）；烟蓟马传播鸢尾花黄斑（iris yellow spot virus，IYSV）等病毒（Chatzivassiliou *et al.*，1999；Kritzman *et al.*，2001；Gent *et al.*，2004）；花蓟马可以传播番茄斑萎病毒（tomato spotted wilt virus，TSWV）（Wijkamp *et al.*，1995）。蓟马通过传播植物病毒所造成的间接危害远远大于其直接危害，如西花蓟马传播的凤仙斑点坏死病毒（INSV）可导致寄主植物减产 30% ~ 50%，严重时可达 70%，甚至导致绝收（Jones *et al.*，2005）。

近几年来，随着国际贸易往来的增多，生物入侵事件频频发生，棕榈蓟马 *T. palmi*（Karny）、西花蓟马等已广泛传入各地，并成为当地主要害虫，对农林业生产造成了巨大影响（Kirk and Terry，2003；Walsh *et al.*，2005）。而快速准确的物种鉴定技术是有效阻止蓟马类害虫进一步扩张，保障农林业生产和生态安全的必要前提，同时也是深入开展蓟马生物学、综合防治等研究的基础。然而，传统的依赖于形态学的鉴定方法常具有一定的局限性，主要体现在：（1）蓟马体型微小、种类繁多，对于非专业从事蓟马分类的人员而言鉴定困难；（2）传统的鉴定方法难以对不同虫态以及肢体残缺的个体进行鉴定；（3）蓟马近缘种之间形态相似，传统方法容易造成错误鉴别（Gaston and May，1992；Fedor *et al.*，2008）。

2003 年，加拿大动物学家 Hebert 等（2003a，2003b）提出利用线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅰ（mitochondrial cytochrome c oxidase subunit Ⅰ gene，mtDNA COⅠ）基因中的一段特定区域对生物进行物种鉴定，并将其称之为 DNA 条形码技术（DNA barcoding）（Hebert *et al.*，2003a，2004a，2004b；Hogg and Hebert，2004）。mtDNA 为多拷贝、分子量小、母性遗传、突变速度快（是核 DNA 突变速度的 10 倍），能准确鉴别物种（Brown *et al.*，1979；Simon *et al.*，1994）。此外，COⅠ基因很少存在插入和缺失，在保证足够变异的同时很容易被通用型引物扩增，且具有较多的系统发育信号，更适合解析亲缘关系密切的生物类群（Taberlet *et al.*，2007）。目前，基于 mtDNA COⅠ基因的 DNA 条形码技术作为一种新的物种鉴定手段，由于其快速、准确、简便的操作流程而被广泛应用，尤其是在保护生物学和生物多样性研究等领域（Valentini *et al.*，2009），已被证明适用于鉴定大部分生物类群，包括昆虫（Hebert *et al.*，2004b；Hajibabaei *et al.*，2006）、鸟类（Hebert *et al.*，2004b；Yoo *et al.*，2006；Kerr *et al.*，2007；Tavares and Baker，2008）、鱼类（Savolainen *et al.*，2005；Ward *et al.*，2005）、线虫类（Elsasser *et al.*，2009）等。在我国，也有一些成功利用 COⅠ基因鉴定物种的报道，例如蚜虫类（王剑峰和乔格侠，2007）、实蝇类（Buahom *et al.*，2011）、雀科鸟类（梁刚等，2008）等。目前国内外已有多篇有关利用 COⅠ基因序列鉴定蓟马种类的文章报道，如：Karimi 等（2010）以 COⅠ通用型引物 LCO1490/HCO2198 扩增出西花蓟马、烟蓟马、棕榈蓟马、普通蓟马 *T. vulgatissimus*（Haliday）、*Haplothrips cenchricola* Strassen、*Ha. distinguendus*（Uzel）、*Ha. setiger* Priesner、*Ha. statices*（Haliday）、*Ha. subtilissimus*（Haliday）等 9 种蓟马的 COⅠ基因部分片段，通过聚类分析明确了其在蓟马种类鉴定中的可用性；Glover 等（2010）以棕榈蓟马、烟蓟马、黄蓟马 *T. flavus*（Schrank）、豆黄蓟马 *T. nigropilosus*（Uzel）、西花蓟马为靶标，验证线粒体 COⅠ，COⅡ和 COⅢ 基因序列和细胞核 ITS-2（internal transcribed spacer 2）与 H3（Histone 3）基因序列在鉴定上述蓟马种类的有效性，结果表明 COⅠ基因与其他基因相比变异程度更高，从而更适合用于物种鉴定；游中华等（2007）用 PCR 产物直接测序法对入侵害虫西花蓟马和其他 8 种蓟马的线粒体 COⅠ基因片段（433 bp）测序，获得 62 个个体的序列，通过种内种间遗传距离和聚类分析，表明 COⅠ基因序列可以达到准确鉴定蓟马物种的目

的；魏书军等(2010)扩增出待鉴定蓟马的 COⅠ基因片段(长度约 410 bp)，通过构建系统发育树对待鉴定蓟马以及另外 38 种蓟马(其 COⅠ序列来源于 NCBI)进行聚类分析，确定该种蓟马为美洲棘蓟马 *Echinothrips americanus* Morgan，表明基于 COⅠ基因序列的条形码技术可以区分不同种类的蓟马，以及鉴定未知种类的蓟马。DNA 条形码技术不仅可用于物种鉴定与系统发育分析(Ardura *et al.*, 2010; Kher *et al.*, 2010)，发现隐存种和新种(Herbert *et al.*, 2003a)，还可应用到其他领域如司法鉴定、生物技术、食品工业和动物营养等(Chase *et al.*, 2005)。

本实验围绕蓟马种类多、个体微小、行踪隐蔽，极易随果蔬、花卉及其种子、苗木等贸易活动传播扩散，对农林业生产造成严重威胁，却难以准确快速鉴定的问题，采用 DNA 条形码技术，以田间常见的蓟马种类 mtDNA COⅠ基因为靶标，进行蓟马类害虫快速分子鉴定识别技术研究。旨在为有效阻止危险性蓟马类害虫的入侵和进一步传播扩散，保护国家贸易信誉和农林业生产安全提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本实验中用于 DNA 条形码技术研究的不同种类的蓟马标本由闵亮采集和在经过形态学鉴定技能培训(主讲专家：华南农业大学资源环境学院张维球教授和童晓立教授)后依据相关资料(韩运发，1997)鉴定确认，具体信息见表 1。

1.2 DNA 提取

蓟马类昆虫 DNA 的提取参照 Moritz 等(2001)报道的方法并稍加改进。用软毛毛笔轻轻挑取单头蓟马，放在滴有 20 μL 提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, l mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 mmol/L NaCl, pH 8.0)的 Parafilm 膜上，以 0.2 mL PCR 管底部作为匀浆器，充分研磨，匀浆液移入 1.5 mL 离心管；用 50 μL 缓冲液清洗匀浆器和 Parafilm 膜 4 次，移入同一离心管；加入 5 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL)，充分混匀后置于水浴锅 60℃水浴 1 h(中途混匀 1 次)；然后加入 220 μL 氯仿/异戊醇(v∶v = 24∶1)，轻柔混匀数十次后，冰浴 30 min；以 4℃ 12 000 r/min，离心 20 min，取上清液(约 200 μL)并加入 440 μL 预冷无水乙醇，轻轻混匀后在 -20℃冰箱放置 30 min；取出后，于 4℃ 12 000 r/min，离心 20 min，小心弃去上清液；加入 440 μL 预冷 75% 乙醇洗涤，4℃ 12 000 r/min，离心 15 min，小心弃去上清液。然后将离心管倒扣于洁净滤纸上，自然干燥 20 min，每管加入 20 μL 超纯水，充分溶解后于 -20℃保存备用。以生物分光光度计测定 DNA 浓度，以 OD_{260}/OD_{280} 值确定其是否被污染。

1.3 PCR 扩增、电泳检测以及序列测定

COⅠ基因序列扩增所使用的 DNA 条形码标准引物 LCO1490 (5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′)和 HCO2198 (5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′) (Folmer *et al.*, 1994)，由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应体系为 25 μL：其中模板 DNA 2 μL (约 500 ng)，10 × Buffer 2 μL(含 Mg^{2+})，dNTPs 0.5 μL (0.2 mmol/L)，上游引物和下游引物各 0.5 μL (5 pmol/L)，Taq DNA 聚合酶 0.2 μL (1.0 U)。反应条件为：94℃预变性 5 min；30 个循环：94℃ 30 s，48℃ 50 s，72℃ 50 s；最后 72℃ 延伸 7 min。取 5 μL PCR 扩增产物，加 2 μL上样缓冲液(0.25% 溴酚兰，40% 蔗糖水溶液)，以 DNA Marker 为参照，在含有染色剂 GoldView 的 1.5% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离(电泳液为 0.5 × TBE)，85 V 电泳 45 min 后，以 GelDoc Universal Hood Ⅱ型凝胶成像系统分析结果。将经电泳检测验证合格的 PCR 产物送北京三博远志生物技术有限公司测序(单向测序)。根据标本数量及 PCR 产物的质量，每种蓟马检测 1 ~ 18 头(表 1)，共计检测 200 头，并将所有 200 条序列录入中国外来入侵物种数据库(Database of Invasive Alien Speies in China) (http://www.chinaias.cn)，其序列登录号见表 1。

1.4 COⅠ序列分析

以 Bioedit 软件读取序列，并对每条序列进行人工碱基读取和反复校对。校正后的碱基序列在 NCBI 上进行同源性比对，以确保获得的序列为目的基因片段。然后，用 ClustalX 软件进行 COⅠ基因序列分析(Herbert *et al.*, 2004b)，用 MEGA4.0 软件以 Kimura 双参数模型计算种内及种间遗传距离(Kumar *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2007)，采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树，以 Q 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)作为外群，系统发育树分支的置信度采用自展法(bootstrap analysis, BP)重复检测 1 000 次。选取每种蓟马所测序列中，出现频率最高的单倍型序列，并结合

表 1　用于 DNA 条形码技术研究的蓟马种类

Table 1　List of thrips (Thysanoptera) species collected from their host plants in different parts of China and used for DNA barcoding in this study

物种编号 Species no.	物种名 Species	寄主 Host plant	采集地点 Collecting locality	采集时间(年-月-日) Collecting date (year-month-day)	测序个体数 Number of sequenced individuals	COⅠ序列登录号* COⅠ sequence accession no.
	蓟马科 Thripidae					
1	端大蓟马 *Megalurothrips distalis* (Karny)	剑兰 *Gladiolus hortulanus*	山东青岛 Qingdao, Shandong	2009-10-11	8	DDJM. 2009. 266003. 1 – DDJM. 2009. 266003. 8
2	苏丹呆蓟马 *Anaphothrips sudanensis* (Trybom)	狗尾草 *Setaria viridis*	河北邯郸 Handan, Hebei	2009-06-06	6	SDDJM. 2009. 056002. 1 – SDDJM. 2009. 056002. 6
3	玉米黄呆蓟马 *An. obscurus* (Müller)	早熟禾 *Poa annua*	陕西宝鸡 Baoji, Shaanxi	2009-06-22	12	YMHDJM. 2009. 721006. 1 – YMHDJM. 2009. 721006. 12
4	西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)	迷你玫瑰 *Rosa rugosa*	北京丰台 Fengtai, Beijing	2010-09-03	18	XHJM. 2010. 100070. 1 – XHJM. 2010. 100070. 18
5	花蓟马 *F. intonsa* (Trybom)	万寿菊 *Tagetes erecta*	吉林白城 Baicheng, Jilin	2009-08-22	14	HJM. 2009. 137000. 1 – HJM. 2009. 137000. 14
6	禾蓟马 *F. tenuicornis* (Uzel)	海棠 *Malus spectabilis*	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	2009-06-08	12	HHJM. 2009. 050011. 1 – HHJM. 2009. 050011. 12
7	豆喙蓟马 *Mycterothrips glycines* (Okamoto)	豇豆 *Vigna sinensis*	广西南宁 Nanning, Guangxi	2008-05-06	8	DHJM. 2008. 530004. 1 – DHJM. 2008. 530004. 8
8	八节黄蓟马 *Thrips flavidulus* (Bagnall)	月季 *Rosa chinensis*	山西运城 Yuncheng, Shanxi	2009-06-25	5	BJHJM. 2009. 044000. 1 – BJHJM. 2009. 044000. 5
9	葱韭蓟马 *T. alliorum* (Priesner)	葱 *Allium fistulosum*	北京密云 Miyun, Beijing	2008-06-03	7	CJJM. 2008. 101599. 1 – CJJM. 2008. 101599. 7
10	杜鹃蓟马 *T. andrewsi* (Bagnall)	美人蕉 *Canna indica*	湖南长沙 Changsha, Hunan	2008-06-24	5	DJJM. 2008. 410128. 1 – DJJM. 2008. 410128. 5
11	黄胸蓟马 *T. hawaiiensis* (Morgan)	玉簪花 *Hosta plantaginea*	吉林松原 Songyuan, Jilin	2009-08-24	10	HXJM. 2009. 138006. 1 – HXJM. 2009. 138006. 10
12	黄蓟马 *T. flavus* (Schrank)	苦瓜 *Momordica charantia*	广西南宁 Nanning, Guangxi	2008-05-04	9	HJM. 2008. 530004. 1 – HJM. 2008. 530004. 9
13	烟蓟马 *T. tabaci* (Lindeman)	万寿菊 *Tagetes erecta*	山东泰安 Tai'an, Shandong	2008-08-02	10	YJM. 2008. 271000. 1 – YJM. 2008. 271000. 10

续表 1 Table 1 continued

物种编号 Species no.	物种名 Species	寄主 Host plant	采集地点 Collecting locality	采集时间(年-月-日) Collecting date (year-month-day)	测序个体数目 Number of sequenced individuals	COⅠ序列登录号* COⅠ sequence accession no.
14	棕榈蓟马 *T. palmi* (Karny)	美人蕉 *Canna indica*	广东广州 Guangzhou, Guangdong	2008-11-22	4	ZLJM. 2008. 510520. 1 – ZLJM. 2008. 510520. 4
15	喜马拉雅蓟马 *T. himalayanus* (Pelikan)	杂草 Unidentified weed	西藏扎囊 Zhanang, Xizang	2008-07-09	2	XMLYJM. 2008. 850800. 1 – XMLYJM. 2008. 850800. 2
16	草木樨近绢蓟马 *Sussericothrips melilotus* Han	白三叶草 *Trrifolium repens*	陕西宝鸡 Baoji, Shaanxi	2009-06-22	7	CMXJJJM. 2009. 721006. 1 – CMXJJJM. 2009. 721006. 7
17	腹小头蓟马 *Microcephalothrips abdominalis* (Crawford)	万寿菊 *Tagetes erecta*	山东青岛 Qingdao, Shandong	2009-10-10	10	FXTJM. 2009. 266003. 1 – FXTJM. 2009. 266003. 10
18	温室蓟马 *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché)	芒果 *Mangifera indica*	福建南通 Nantong, Fujian	2010-07-24	15	WSJM. 2010. 350111. 1 – WSJM. 2010. 350111. 15
	管蓟马科 Phlaeothripidae					
19	榕母管蓟马 *Gynaikothrips ficorum* (Marchal)	榕树 *Ficus microcarpa*	广西南宁 Nanning, Guangxi	2007-10-21	6	RMGJM. 2007. 530001. 1 – RMGJM. 2007. 530001. 6
20	华简管蓟马 *Haplothrips chinensis* (Priesner)	月季 *Rosa chinensis*	湖北荆州 Jingzhou, Hubei	2008-05-21	15	HJGJM. 2008. 434025. 1 – HJGJM. 2008. 434025. 15
21	菊简管蓟马 *Ha. gowdeyi* (Franklin)	雏菊 *Bellis perennis*	广西南宁 Nanning, Guangxi	2008-04-26	8	JJGJM. 2008. 530003. 1 – JJGJM. 2008. 530003. 8
	纹蓟马科 Aeolothripidae					
22	黑白纹蓟马 *Aeolothrips melaleucus* (Haliday)	青篙 *Artemisia annua*	河北承德 Chengde, Hebei	2008-07-04	4	HBWJM. 2008. 068451. 1 – HBWJM. 2008. 068451. 4
23	横纹蓟马 *Aeo. fasciatus* (Linnaeus)	菊花 *Dendranthema morifolium*	甘肃酒泉 Jiuquan, Gansu	2008-08-11	3	HWJM. 2008. 736202. 1 – HWJM. 2008. 736202. 3
24	新疆纹蓟马 *Aeo. xinjiangensis* Han	翠菊 *Callistephus chinensis*	甘肃酒泉 Jiuquan, Gansu	2007-09-01	1	XJWJM. 2007. 736202. 1
25	西藏纹蓟马 *Aeo. xizangensis* Han	杂草 Unidentified weed	西藏扎囊 Zhanang, Xizang	2008-07-09	1	XZWJM. 2008. 850800. 1

* 中国外来入侵物种数据库 Database of Invasive Alien Species in China (http://www.chinaias.cn).

NCBI 中已公开的蓟马 COⅠ序列中 21 种蓟马的 COⅠ序列(蓟马种类与登录号见表 2)，采用邻接法构建系统进化树，BP 重复检测 1 000 次。

表 2　用于 DNA 条形码技术研究的 NCBI 中的蓟马种类

Table 2　The thrips (Thysanoptera) species used in DNA barcoding with their COⅠ sequence data from NCBI databases

种类 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.	种类 Species	GenBank 登录号 GenBank accession no.
Thrips coloratus (Schmutz)	AB277221	*Odo. loti* (Haliday)	FN546024
T. fuscipennis (Haliday)	FN546128	*Odo. meliloti* (Priesner)	HQ605963
T. major (Uzel)	FN546079	*Odo. ulicis* (Haliday)	FN546022
T. nigropilosus (Uzel)	AM932052	*Scirtothrips dorsalis* (Hood)	GU570439
T. vulgatissimus (Haliday)	FN546068	*Aeolothrips albicinctus* (Haliday)	FN545942
Chirothrips meridionalis (Bagnall)	FN545954	*Haplothrips cenchricola* Strassen	FN545925
Dendrothrips degeeri (Uzel)	FN545969	*Ha. distinguendus* (Uzel)	FN545929
Lefroyothrips lefroyi (Bagnall)	JF719601	*Ha. setiger* Priesner	FN545939
Liothrips tractabilis Mound	GU942811	*Ha. statices* (Haliday)	FN545936
Odontothrips biuncus (John)	FN546026	*Ha. subtilissimus* (Haliday)	FN545933
Odo. ignobilis (Bagnall)	FN546028		

2　结果与分析

2.1　PCR 扩增、序列测定及同源性分析

分别以 25 种蓟马的 DNA 为模板，以 DNA 条形码通用型引物 LCO1490/HCO2198 进行 PCR 扩增，电泳检测结果显示，每种蓟马均可扩增出清晰的长度约为 690 bp 的靶标片段(图 1)。对电泳检测验证合格的 PCR 产物进行纯化和序列测定，并将所得序列用 ClustalX 软件一并比对，修剪成长度为 640 bp 的片段进行分析。然后在 NCBI 中进行同源性比对，结果表明，25 种蓟马的 COⅠ碱基序列与数据库中已知的靶标种类相对应的 COⅠ基因片段的同源性为 98.0%~100%，说明所获得的 COⅠ序列准确可靠。

2.2　种内与种间遗传距离

应用 MEGA4.0 中的 Kimura 双参数模型计算 25 种蓟马 200 条 COⅠ基因序列的种内与种间遗传距离，结果显示，种内遗传距离为 0.0000 ~ 0.0108，平均为 0.0027；其中，杜鹃蓟马 *T. andrewsi* (Bagnall)、温室蓟马 *Heliothrips haemorrhoidalis* (Bouché) 和黑白纹蓟马 *Aeolothrips melaleucus* (Haliday) 的种内遗传距离最小，为 0.0000；菊简管蓟马 *Ha. gowdeyi* (Franklin) 的种内遗传距离最大，为 0.0108。种间平均遗传距离为 0.2757，其中榕母管蓟马 *Gynaikothrips ficorum* (Marchal) 与西藏纹蓟马 *Aeo. xizangensis* Han 之间的遗传距离最大，为 0.4613；杜鹃蓟马和棕榈蓟马之间的遗传距离最小，为 0.0320(表 3)。

2.3　系统发育树构建

以 25 种蓟马共计 200 条序列构建的 NJ 系统发育树，其聚类分析结果表明，同一科(即蓟马科、纹蓟马科、管蓟马科)不同属种的蓟马聚为一大支；同一种类、不同个体的蓟马聚为一小支，且最初分支自展值均为 100% (图 2)。此外，蓟马属的黄胸蓟马 *T. hawaiiensis* (Morgan)、黄蓟马、八节黄蓟马 *T. flavidulus* (Bagnall) 与小头蓟马属的腹小头蓟马 *Microcephalothrips abdominalis* (Crawford) 聚为一支；杜鹃蓟马、棕榈蓟马、烟蓟马聚为一支；喜马拉雅蓟马 *T. himalayanus* (Pelikan) 与葱韭蓟马 *T. alliorum* (Priesner) 聚为一支；花蓟马属的 3 个近缘种，西花蓟马、花蓟马、禾蓟马 *F. tenuicornis* (Uzel) 聚为一支；呆蓟马属的苏丹呆蓟马 *Anaphothrips sudanensis* (Trybom) 和玉米黄呆蓟马 *An. obscurus* (Müller)、阳针蓟马属的温室蓟马以及近绢蓟马属的草木樨近绢蓟马 *Sussericothrips melilotus* Han 聚为一支(图 2)。从 25 种蓟马中，分别选取每种蓟马出现频率最高的单倍型序列，并结合 NCBI 中其他 21 种蓟马 COⅠ基因的部分序列构建系统发育树；聚类分析结果表明，不同种类的蓟

表 3 25 种蓟马种内与种间遗传距离

Table 3 Intra- and inter-species genetic distances of the 25 thrips species collected in this study

	种间 Interspecies																									种内
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Intraspecies
1																										0.000
2	0.242																									0.001
3	0.210	0.166																								0.000
4	0.211	0.253	0.246																							0.003
5	0.217	0.253	0.275	0.206																						0.006
6	0.253	0.240	0.247	0.190	0.195																					0.000
7	0.094	0.230	0.226	0.209	0.239	0.235																				0.000
8	0.206	0.239	0.258	0.213	0.224	0.217	0.226																			0.001
9	0.195	0.240	0.224	0.190	0.224	0.229	0.230	0.157																		0.002
10	0.189	0.191	0.224	0.196	0.226	0.219	0.187	0.156	0.147																	0.000
11	0.230	0.219	0.276	0.238	0.252	0.245	0.242	0.120	0.208	0.185																0.004
12	0.232	0.254	0.266	0.226	0.237	0.222	0.239	0.186	0.191	0.171	0.210															0.003
13	0.230	0.218	0.225	0.234	0.211	0.222	0.221	0.203	0.195	0.161	0.232	0.215														0.000
14	0.199	0.202	0.240	0.202	0.206	0.202	0.191	0.167	0.149	0.032	0.186	0.169	0.167													0.005
15	0.182	0.247	0.227	0.173	0.218	0.213	0.212	0.159	0.092	0.131	0.190	0.178	0.177	0.145												0.004
16	0.193	0.240	0.239	0.230	0.211	0.252	0.233	0.198	0.204	0.195	0.220	0.231	0.216	0.213	0.199											0.000
17	0.235	0.258	0.270	0.224	0.238	0.224	0.234	0.177	0.194	0.174	0.207	0.203	0.232	0.170	0.188	0.219										0.003
18	0.208	0.200	0.215	0.222	0.259	0.253	0.226	0.217	0.208	0.160	0.247	0.213	0.224	0.1669	0.188	0.209	0.219									0.000
19	0.366	0.394	0.372	0.377	0.408	0.394	0.407	0.416	0.342	0.380	0.414	0.403	0.383	0.402	0.332	0.377	0.391	0.372								0.000
20	0.361	0.423	0.383	0.428	0.405	0.406	0.413	0.434	0.375	0.388	0.447	0.427	0.400	0.405	0.375	0.410	0.394	0.408	0.194							0.003
21	0.333	0.401	0.360	0.361	0.377	0.380	0.393	0.396	0.350	0.356	0.399	0.375	0.380	0.374	0.330	0.348	0.361	0.374	0.172	0.106						0.011
22	0.306	0.330	0.333	0.312	0.306	0.305	0.301	0.279	0.336	0.303	0.314	0.292	0.277	0.302	0.300	0.302	0.291	0.310	0.412	0.456	0.411					0.002
23	0.304	0.323	0.342	0.300	0.313	0.307	0.287	0.276	0.316	0.253	0.296	0.289	0.306	0.282	0.288	0.283	0.307	0.294	0.452	0.425	0.404	0.253				0.005
24	0.278	0.320	0.329	0.284	0.303	0.307	0.291	0.256	0.281	0.249	0.305	0.292	0.285	0.270	0.273	0.263	0.276	0.285	0.396	0.421	0.386	0.136	0.209			–
25	0.336	0.328	0.321	0.317	0.316	0.322	0.326	0.333	0.324	0.305	0.347	0.351	0.3446	0.305	0.320	0.321	0.339	0.322	0.461	0.448	0.430	0.261	0.214	0.245		–

1 –25：蓟马种类编号，同表 1 Species no. of thrips, same as in Table 1.

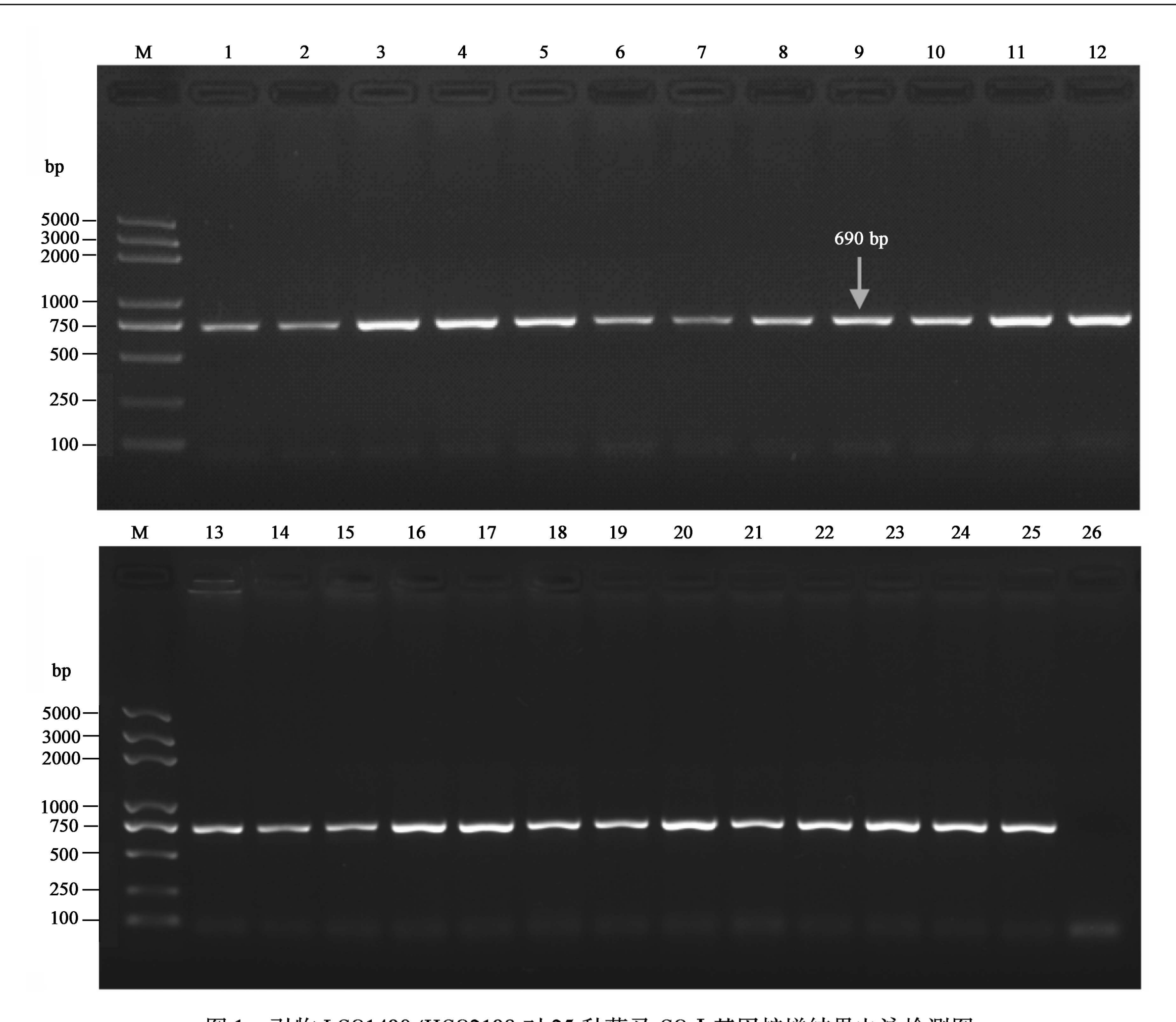


图 1　引物 LCO1490/HCO2198 对 25 种蓟马 COⅠ基因扩增结果电泳检测图

Fig. 1　Amplification pattern of the COⅠ gene in the 25 thrips species using the universal DNA barcoding primers LCO1490/HCO2198

M：DNA 分子量标准 DNA ladder；1 –25：蓟马物种编号，同表 1 Species no. of thrips, same as in Table 1；26：阴性对照（水）Negative control (water).

马位于不同的分支，不同种属的蓟马种类区别明显（图 3）。

3　结论与讨论

DNA 条形码技术的有效性，必须满足两个条件。其一，两个物种不能拥有完全一致的序列，即每个物种具有独特的 DNA 条形码，物种间无共享型序列；其二，种间差异应远大于种内差异（Hebert *et al.*, 2004a, 2004b；Yoo *et al.*, 2006）。本实验通过对我国田间常见的 25 种蓟马 COⅠ基因靶标片段碱基序列的测定和比对分析，表明蓟马种类不同其 DNA 条形编码序列各异，且未发现共享型序列；同一种类不同个体间的 DNA 条形编码序列差异很小，为 0.0000 ~0.0108，平均为 0.0027；而种间差异较大，为 0.0320 ~0.4613，平均为 0.2757；种间遗传距离是种内遗传距离的 102.1 倍。完全符合 DAN 条形码有效性的检验标准，即种间差异应大于 0.02（Hebert *et al.*, 2003a）。Brunner 等（2002）以 COⅠ通用型引物 mtD-7.2F/mtD-9.2R 扩增出包括西花蓟马、烟蓟马、棕榈蓟马等在内的 10 种蓟马的 COⅠ基因片段（其长度为 433 bp，包含于 DNA 条形码靶标序列（约 650 bp）之中，对齐位置约从 200 bp 开始），通过序列比对，表明同种蓟马不同个体间差异细微，而种间差异显著，其遗传距离为 0.186。游中华等（2007）利用 Brunner 等（2002）设计的简并引物扩增出包括西花蓟马在内的 9 种蓟马的 COⅠ基因片段（433 bp），数据分析显示，种内不同个体间的遗传距离为 0.000 ~0.005；而种间遗传距离为 0.154 ~0.259，平均为 0.213。

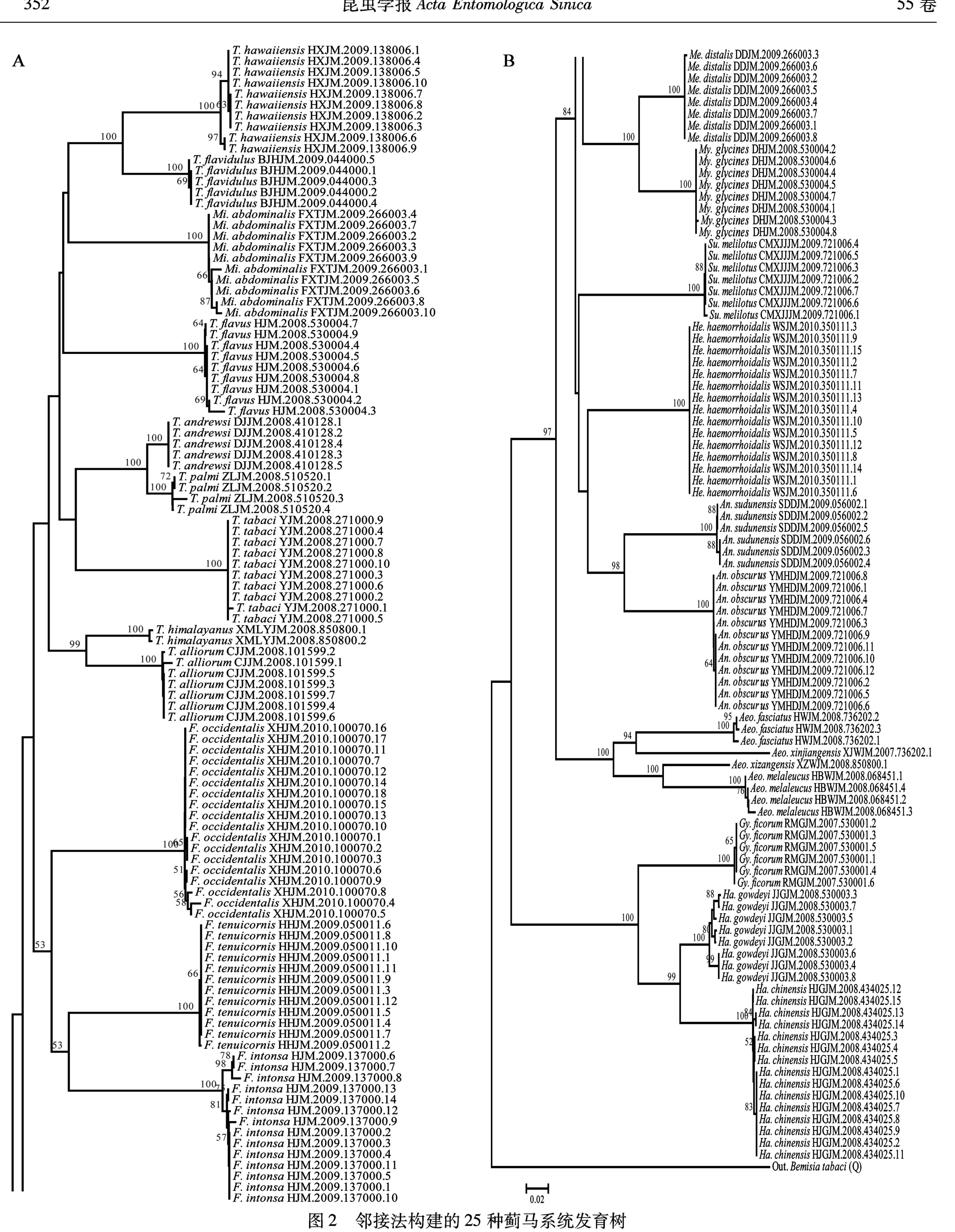


图 2 邻接法构建的 25 种蓟马系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining tree based on the analysis of COⅠ gene sequences of the 25 thrips species collected in this study

A：树上半部 Upper half of the tree；B：树下半部 Lower half of the tree. 分支处上方数值表示重复 1 000 次后的自展值（>50%）；标尺示遗传距离. Numbers above branches are bootstrap values (>50%) under 1 000 replicates. The scale bar represents the genetic distance. ***T.***：蓟马属 *Thrips*；***Mi.***：小头蓟马属 *Microcephalothrips*；***F.***：花蓟马属 *Frankliniella*；***Me.***：大蓟马属 *Megalurothrips*；***My.***：喙蓟马属 *Mycterothrips*；***Su.***：近绢蓟马属 *Sussericothrips*；***He.***：阳针蓟马属 *Heliothrips*；***An.***：呆蓟马属 *Anaphothrips*；***Aeo.***：纹蓟马属 *Aeolothrips*；***Ha.***：简管蓟马属 *Haplothrips*；***Gy.***：母管蓟马属 *Gynaikothrips*.

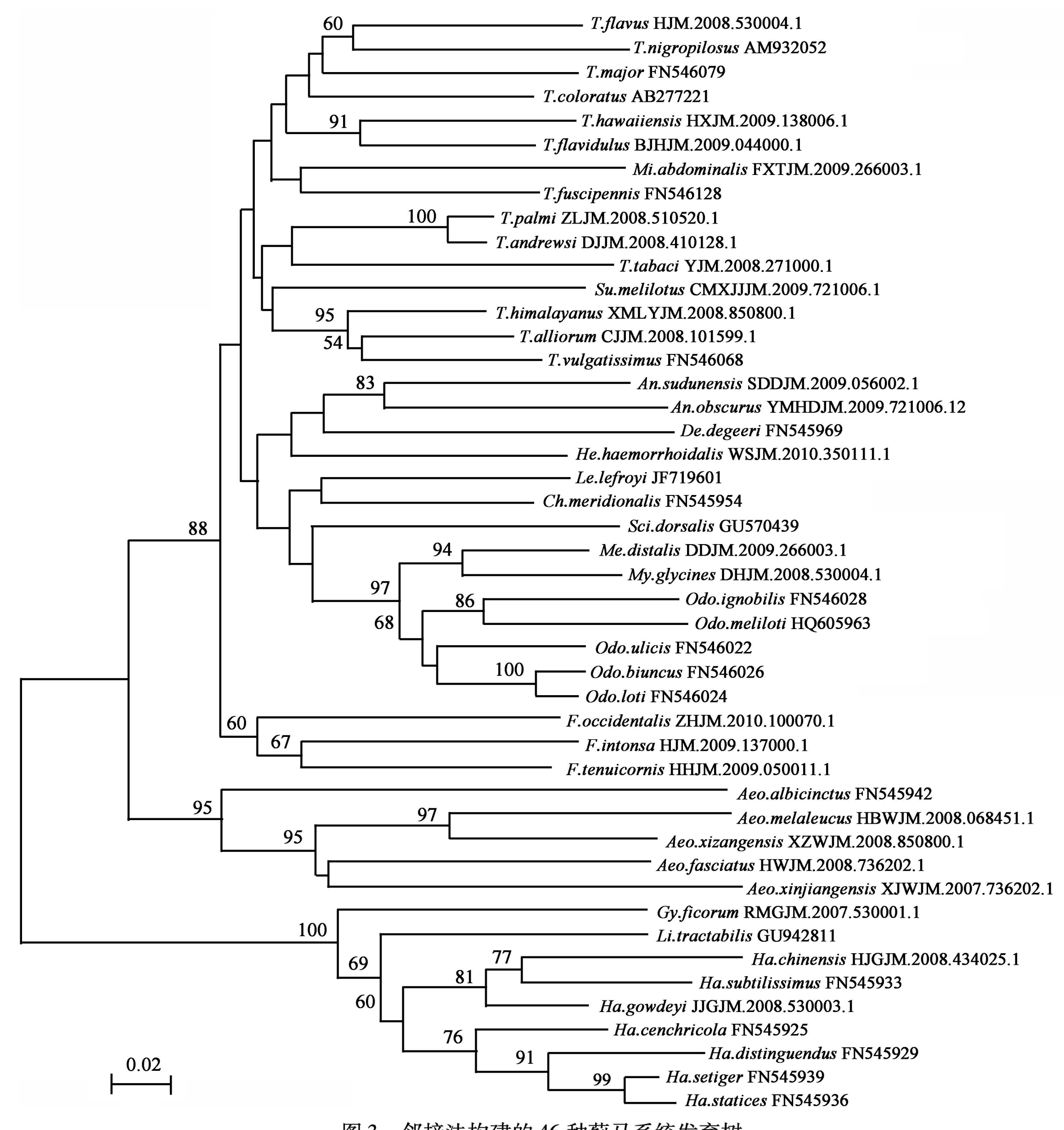


图 3　邻接法构建的 46 种蓟马系统发育树

Fig. 3　Neighbor-joining tree based on the analysis of COI gene sequences of the 46 thrips species from this study and NCBI databases

分支处上方数值表示重复 1 000 次后的自展值(>50%)；标尺示遗传距离. Numbers above branches are bootstrap values (>50%) under 1 000 replicates. The scale bar represents the genetic distance. *T.*：蓟马属 *Thrips*；*Mi.*：小头蓟马属 *Microcephalothrips*；*F.*：花蓟马属 *Frankliniella*；*Me.*：大蓟马属 *Megalurothrips*；*My.*：喙蓟马属 *Mycterothrips*；*Su.*：近绢蓟马属 *Sussericothrips*；*He.*：阳针蓟马属 *Heliothrips*；*An.*：呆蓟马属 *Anaphothrips*；*Aeo.*：纹蓟马属 *Aeolothrips*；*Ha.*：简管蓟马属 *Haplothrips*；*Gy.*：母管蓟马属 *Gynaikothrips*；*Ch.*：指蓟马属 *Chirothrips*；*De.*：棍蓟马属 *Dendrothrips*；*Le.*：三鬃蓟马属 *Lefroyothrips*；*Li.*：滑管蓟马属 *Liothrips*；*Odo.*：齿蓟马属 *Odontothrips*；*Sci.*：硬蓟马属 *Scirtothrips*.

Aliabadian 等(2009)提出，能否准确鉴定物种，主要取决于所选靶标物种的种间遗传距离与种内遗传距离之间的分离程度，当种间遗传距离和种内遗传距离没有重叠时，物种就能准确地被鉴定。本研究对我国常见蓟马的种内遗传距离与种间遗传距离的分布频率进行了分析，结果显示 25 种蓟马的种内遗传距离与种间遗传距离间没有重叠区域（图 4)，表明 DNA 条形码技术能有效区分蓟马种类。

构建系统发育树进行物种聚类，是在得到某一个体的分子数据后对其进行物种确定时的较为直观的方法。根据 CO Ⅰ 基因的碱基序列信息构建的 NJ 系统发育树（图 2)，其聚类结果与形态学鉴定的物种分类地位一致，即种间分支较长，而种内分支较短，每个单系分支对应一个物种，支持率均为 100%。以本研究中测得的 25 种蓟马的 CO Ⅰ 序列，结合 NCBI 中已公开的 21 种蓟马的 CO Ⅰ 基因序列，共同

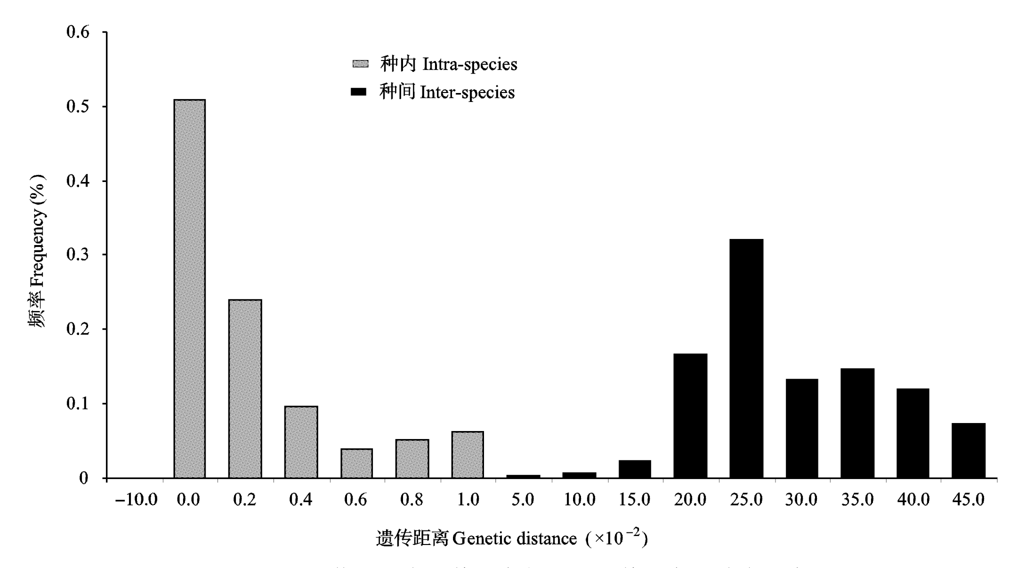


图 4　25 种蓟马种内遗传距离与种间遗传距离的分布频率

Fig. 4　Frequency distribution of the K2-P intra- and inter-species genetic distances of the 25 thrips species collected in this study

构建46 种蓟马（分属 3 科 17 属）（种类及登录号见表1，2）系统发育树（图3），每种蓟马均具有一独立分支，进一步佐证了 DNA 条形码的物种鉴定功能。

同时，DNA 条形码技术在形态相近的近缘种蓟马的识别鉴定中也具有很好的应用效果，如蓟马属的黄蓟马与棕榈蓟马在外部形态上极为相似（Glover *et al.*，2010），两者识别要点主要依据单眼间鬃在3 个单眼间的着生位置，其中，棕榈蓟马的单眼间鬃位于前后单眼中心连线之外，而黄蓟马的单眼间鬃位于连线之内；而 DNA 条形码序列分析结果显示，两物种间无共享型序列且两者遗传距离为0.169，在 NJ 树上体现为两者分别处于两个分支。又如，花蓟马属的西花蓟马、花蓟马和禾蓟马为近缘种，且形态相似，但通过遗传距离分析以及据此构建的系统发育树完全可以将3 种蓟马准确地区分开。表明该技术体系在有效阻止检疫性蓟马类害虫如西花蓟马、棕榈蓟马等的传播扩散中具有重要应用价值。

近年来，已有多种分子标记技术用于蓟马种类鉴定，如 Toda 和 Komazaki（2002）应用 RFLP（restriction fragment length polymorphism）标记技术，通过对西花蓟马、花蓟马、棕榈蓟马、烟蓟马、黄胸蓟马、色蓟马 *T. coloratus*（Schmutz）、黄蓟马、茶黄硬蓟马 *Scirtothrips dorsalis*（Hood）、*T. setotus* Moulton 等9 种蓟马的 ITS-2 序列分析，设计出适于扩增蓟马 ITS 片段的特异性引物，并从 82 种限制性内切酶中筛选出2 种内切酶用于鉴别日本果树上这9 种常见蓟马。孟祥钦等（2010）采用 SCAR（sequence characterized amplified region）标记技术，设计了1 对特异性引物 FOMF/FOMR，该对引物只对西花蓟马具有扩增能力，对田间常见的其他 41 种蓟马不具有扩增效果。Huang 等（2010）根据西花蓟马、花蓟马和梳缺花蓟马 *F. schultzei*（Trybom）已知的 RNA 基因序列设计了2 套西花蓟马特异性引物和探针，建立了西花蓟马 qPCR（real-time quantitative PCR）检测体系，有效地将西花蓟马与其他常见的6 种蓟马[花蓟马、梳缺花蓟马、烟蓟马、茶黄硬蓟马、*Caliothrips fasciapennis*（Hind）和 *Tubulifera*]区分开。然而，上述方法鉴定检测的蓟马种类有限，而且无法明确非靶标种的具体种类。本研究以 DNA 条形码技术，获得我国常见的25 种蓟马的 COⅠ基因序列(200 条)，通过种内、种间遗传距离和序列聚类分析，并结合 NCBI 中已公开的部分蓟马 COⅠ基因序列，证实 DNA 条形码技术完全可以用于蓟马种类的识别与鉴定。该方法不仅高通量、操作简便、经济有效，而且随着其他蓟马种类 COⅠ基因序列信息的不断补充与完善，必将在口岸检疫检验以及有效阻止危险性蓟马类害虫的入侵和扩散、保护农业生产安全、生态安全和国际贸易信誉中发挥巨大作用。

参考文献（References）

Aliabadian M, Kaboli M, Nijman V, Vences M, 2009. Molecular

identification of birds: performance of distance-based DNA barcoding in three genes to delimit parapatric species. *PLoS ONE*, 4(1): e4119.

Ardura A, Pola IG, Ginuino I, Gomes V, Garcia-Vazquez E, 2010. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labeling. *Food Research International*, 43(5): 1549–1552.

Bezzara IC, Resende Rde O, Pozzer L, Nagata T, Kormelink R, Deávila AC, 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. *Phytopathology*, 89(9): 823–830.

Brown WM, George M, Wilson AC, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(4): 1967–1971.

Brunner PC, Fleming C, Frey JE, 2002. A molecular identification key for economically important thrips species (Thysanoptera: Thripidae) using direct sequencing and a PCR-RFLP-based approach. *Agricultural and Forest Entomology*, 4(2): 127–136.

Buahom N, Li ZH, Wu JJ, Liu JQ, 2011. Molecular identification of fruit fly larvae from Thailand based on DNA barcoding. *Plant Quarantine*, 25(1): 49–52. [Buahom N, 李志红, 吴佳教, 刘佳琪, 2011. 基于 DNA 条形码技术的泰国番石榴中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物检疫, 25(1): 49–52]

Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V, 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 360(1462): 1889–1895.

Chatzivassiliou EK, Nagata T, Katis NI, Peters D, 1999. Transmission of tomato spotted wilt tospovirus by *Thrips tabaci* populations originating from leek. *Plant Pathology*, 48(6): 700–706.

Elsasser SC, Floyd R, Hebert PDN, Schulte-Hostedde AI, 2009. Species identification of North American guinea worms (Nematoda: Dracunculus) with DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 9(3): 707–712.

Fedor P, Malenovsky I, Vanhara J, Sierka W, Havel J, 2008. Thrips (Thysanoptera) identification using artificial neural networks. *Bulletin of Entomological Research*, 98(5): 437–447.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.

Gaston KJ, May RM, 1992. Taxonomy of taxonomists. *Nature*, 356: 281–282.

Gent DH, Schwartz HF, Khosla R, 2004. Distribution and incidence of Iris yellow spot virus in Colorado and its relation to onion plant population and yield. *Plant Disease*, 88(5): 446–452.

Glover RH, Collins DW, Walsh K, Boonham N, 2010. Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Molecular Ecology Resources*, 10(1): 51–59.

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4): 968–971.

Han YF, 1997. Economic Insect Fauna of China, Fasc. 55. Thysanoptera. Science Press, Beijing. 514 pp. [韩运发, 1997. 中国经济昆虫志, 第五十五册, 缨翅目. 北京: 科学出版社. 514 页]

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of B Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotroical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41): 14812–14817.

Hebert PDN, Ratnasingham S, DeWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 270(1): S96–S99.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM, 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2(10): 1657–1663.

Hogg ID, Hebert PDN, 2004. Biological identifications of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology*, 82(5): 749–754.

Huang KS, Lee SE, Yeh Y, Shen GS, Mei E, Chang CM, 2010. Taqman real-time quantitative PCR for identification of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) for plant quarantine. *Biology Letters*, 6(4): 555–557.

Jones T, Scott-Dupree C, Harris R, Shipp L, Harris B, 2005. The efficacy of spinosad against the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, and its impact on associated biological control agents on greenhouse cucumbers in southern Ontario. *Pest Management Science*, 61(2): 179–185.

Karimi J, Hassani-Kakhki M, Awal MM, 2010. Identifying thrips (Insecta: Thysanoptera) using DNA barcodes. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2(1): 35–41.

Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, Hebert PDN, 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7(4): 535–543.

Kher CP, Doerder FP, Cooper J, Ikonomi P, Achilles-Day U, Küpper FC, Lynn DH, 2010. Barcoding *Tetrahymena*: discriminating species and identifying unknowns using the cytochrome c oxidase subunit I (cox-1) barcode. *Protist*, 162(1): 2–13.

Kirk WDJ, Terry LI, 2003. The spread of the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Agricultural and Forest Entomology*, 5(4): 301–310.

Kritzman A, Lampel M, Raccah B, Gera A, 2001. Distribution and transmission of *Iris yellow spot virus*. *Plant Disease*, 85(8): 838–842.

Kumar S, Tamura K, Nei M, 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5(2): 150–163.

Liang G, Li T, Yin ZH, Lei FM, 2008. Molecular phylogenetic analysis

of some Fringillidae species based on mitochondrial CO Ⅰ gene sequences. *Zoological Research*, 29(5): 465 – 475. [梁刚, 李涛, 尹祚华, 雷富民, 2008. 利用 CO Ⅰ 基因序列对雀科鸟类的分子系统发育关系初探. 动物学研究, 29(5): 465 – 475]

Lu H, Gong YJ, Shi BC, Song JY, 2007. Spatial distribution pattern and sampling of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae), on cucumber and green bean. *Acta Entomologica Sinica*, 50(11): 1187 – 1193. [路虹, 宫亚军, 石宝才, 宋婧祎, 2007. 西花蓟马在黄瓜和架豆上的空间分布型及理论抽样数. 昆虫学报, 50(11): 1187 – 1193]

Meng XQ, Min L, Wan FH, Zhou ZS, Wang WK, Zhang GF, 2010. SCAR marker for rapid identification of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 323 – 330. [孟祥钦, 闵亮, 万方浩, 周忠实, 王文凯, 张桂芬, 2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. 昆虫学报, 53(3): 323 – 330]

Moritz G, Paulsen M, Delker C, Picl S, Kumm S, 2001. Identification of thrips using ITS-RFLP analysis. In: Marullo R ed. Thrips and Tospoviruses: Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera. CSIRO Publishing, Canberra. 365 – 367.

Morse JG, Hoddle MS, 2006. Invasion biology of thrips. *Annual Review of Entomology*, 51: 67 – 89.

Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R, 2005. Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 360(1462): 1805 – 1811.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651 – 701.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev E, 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35(3): e14.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8): 1596 – 1599.

Tavares ES, Baker AJ, 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1): 81.

Toda S, Komazaki S, 2002. Identification of thrips species (Thysanoptera: Thripidae) on Japanese fruit trees by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal ITS-2 region. *Bulletin of Entomological Research*, 92: 359 – 363.

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2): 110 – 117.

Walsh K, Boonham N, Barker I, Collins DW, 2005. Development of a sequence-specific real-time PCR to the melon thrips *Thrips palmi* (Thysan., Thripidae). *Journal of Applied Entomology*, 129 (5): 272 – 279.

Wang JF, Qiao GX, 2007. Application of DNA barcoding to Aphidinea (Insecta: Hemiptera) studies. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 32(1): 153 – 159. [王剑峰, 乔格侠, 2007. DNA 条形编码在蚜虫类昆虫中的应用. 动物分类学报, 32(1): 153 – 159.]

Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 360(1462): 1847 – 1857.

Wei SJ, Ma JD, Shi BC, Gong YJ, Liu J, Kang ZJ, Chen XX, Lu H, 2010. External morphology and molecular identification of the newly found invasive pest *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 53 (6): 715 – 720. [魏书军, 马吉德, 石宝才, 宫亚军, 刘静, 康总江, 陈学新, 路虹, 2010. 我国新入侵外来害虫美洲棘蓟马的外部形态和分子鉴定. 昆虫学报, 53(6): 715 – 720]

Wijkamp I, Almarza N, Goldbach R, Peters D, 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. *Phytopathology*, 85 (10): 1069 – 1074.

Wijkamp I, Peters D, 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, 83(9): 986 – 991.

Yoo HS, Eah YJ, Kim JS, Kim YJ, Min MS, Pack WK, Lee H, Kim CB, 2006. DNA barcoding Korean birds. *Korean Society of Molecular and Cellular Biology*, 22(3): 323 – 327.

You ZH, Lu H, Zhang XS, Feng JN, Shi BC, Gong YJ, Huang DW, 2007. Molecular identification of the introduced western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) and other eight common thrips species (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(7): 720 – 726. [游中华, 路虹, 张宪省, 冯纪年, 石宝才, 宫亚军, 黄大卫, 2007. 入侵害虫西花蓟马及其他 8 种常见蓟马的分子鉴定. 昆虫学报, 50(7): 720 – 726]

(责任编辑: 武晓颖)